ChinaXiv合作期刊

doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.04.16

J South Med Univ, 2015, 35(4): 544-548

基础研究

人可溶性DC-SIGN抑制未成熟树突状细胞吞噬金黄色葡萄球菌

李慧杰[1],许天昱[1],周 嘉[1],朱玲燕[2],张丽芸[1],卢 晓[1],陈政良[1]

[1]南方医科大学基础医学院免疫学教研室,广东 广州 510515;[2]中山大学生命科学学院,广东 广州 510275

摘要:目的 研究可溶性DC-SIGN(sDC-SIGN)对未成熟树突状细胞(imDC)吞噬金黄色葡萄球菌(金葡菌)的影响及机制。**方法** 采用流式细胞术分析sDC-SIGN对imDC吞噬金葡菌的影响;ELISA检测sDC-SIGN分别与金葡菌、脂磷壁酸、脂多糖的结合;观察配体甘露聚糖、脂磷壁酸以及抗人DC-SIGN抗体1C6和4H3对sDC-SIGN与金葡菌结合的影响。**结果** sDC-SIGN能抑制imDC对金葡菌的吞噬。sDC-SIGN与金葡菌结合,且呈Ca^{2+}依赖性;以浓度依赖方式与脂磷壁酸结合,但不与脂多糖结合;sDC-SIGN与金葡菌的结合可被甘露聚糖、金葡菌磷壁酸和1C6、4H3阻断。**结论** sDC-SIGN通过优先与金葡菌表面的一些糖成分结合而影响imDC膜表面DC-SIGN与金葡菌的结合,从而抑制了imDC对金葡菌的吞噬。

关键词:可溶性DC-SIGN;树突状细胞;金黄色葡萄球菌;吞噬;结合

Human soluble dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin inhibits phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by immature dendritic cells

LI Huijie[1], XU Tianyu[1], ZHOU Jia[1], ZHU Lingyan[2], ZHANG Liyun[1], LU Xiao[1], CHEN Zhengliang[1]

[1]Department of Immunology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]School of life sciences, sun yat-sen university, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of soluble dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (sDC-SIGN) on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) by immature dendritic cells (imDCs). **Methods** Flow cytometry was employed to examine the effect of sDC-SIGN on the phagocytosis of *S. aureus* by imDCs. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze the binging of sDC-SIGN to *S. aureus*, lipoteichoic acid (LTA) and lipopolysaccharides (LPS) and investigate the effect of the ligands mannan and LTA and anti-DC-SIGN antibodies 1C6 and 4H3 on the binging of sDC-SIGN to *S. aureus*. **Results** sDC-SIGN inhibited the phagocytosis of *S. aureus* by imDCs. sDC-SIGN bound to *S. aureus* in a Ca^{2+}-dependent manner. sDC-SIGN concentration-dependently bound to LTA, but not to LTA, and the binging of sDC-SIGN to *S. aureus* was blocked by mannan, LTA, 1C6 and 4H3. **Conclusion** sDC-SIGN preferentially binds to the carbohydrate constituents on *S. aureus* to affect the binding between membrane-bound DC-SIGN and *S. aureus*, thus suppressing the phagocytosis of *S. aureus* by imDCs.

Key words: soluble dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin; dendritic cells; *Staphylococcus aureus*; phagocytosis; binding

chinaXiv:201712.01099v1

树突状细胞(dendritic cell, DC)是能力最强的抗原提呈细胞(antigen presentation cell, APC)。DC特异的结合细胞间黏附分子3的非整合素(DC-specific intercellular adhesion molecule3-grabbing nonintegrin, DC-SIGN, CD209)属于C型凝集素家族成员,为Ⅱ型跨膜蛋白,由胞浆区、跨膜区、颈区和胞外区构成,其天然配体是细胞或病原体表面的甘露糖等结构。DC-SIGN是一种天然免疫模式识别分子(pattern-recognition receptors, PRR),主要分布在DC膜表面[1-2]。借助PRR,DC可识别病原体表达的高度保守的分子结构即病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMP),在DC诱导的免疫应答中起着非常重要的作用[3-4]。2001年,Mummidi等[5]发现细胞内存在多种无跨膜区和胞浆区的短截DC-SIGN mRNA剪切体,并认为其编码可溶性DC-SIGN(soluble DC-SIGN, sDC-SIGN)。2011年,Plazolles等[6]采用在DC培养上清、人血清和类风湿关节炎病人关节液中检测到sDC-SIGN,发现人体液中sDC-SIGN含量与疾病相关。本实验室从健康产妇胎盘中提取了RNA,克隆了人DC-SIGN cDNA,表达了融合蛋白sDC-SIGN-GST[7],并对其功能进行了研究,发现sDC-SIGN可抑制Con A或anti-CD3/CD28活化T细胞的CD69表达、细胞增殖及细胞因子的分泌[8]。为更好地研究sDC-SIGN的作用,我们又优化表达了无标签蛋白的sDC-SIGN[9]。有研究发现未成熟DC

收稿日期:2014-11-16

基金项目:国家自然科学基金(B0972679)

Supported by National Natural Science Foundation of China (B0972679).

作者简介:李慧杰,硕士研究生,E-mail: 316135472@qq.com

通信作者:陈政良,博士,教授,博士生导师,E-mail: zhlchen@fimmu.com

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201712.01099v1

(immmature DC, imDC)可吞噬金黄色葡萄球菌(金葡菌)[10],且DC-SIGN胞外段-IgG Fc嵌合蛋白能结合幽门螺杆菌、结核杆菌的裂菌产物及血吸虫提取物[11]。因此,本实验就sDC-SIGN对imDC吞噬金葡菌的影响及其机制进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料

重组质粒pET-17b-sDC-SIGN由本室构建[7]并保存;IL-4、GM-CSF购自Sigma;抗人DC-SIGN抗体(DCN46)购自美国BD Biosciences Pharmingen;1C6、4H3为本室制备的抗sDC-SIGN单克隆抗体;*E.coli* BL21(DE3)表达菌为本室保存;HRP-羊抗鼠IgG抗体购自博奥森公司;CFSE购自Invitrogen;LTA购自Sigma;金葡菌菌株43300由本室保存。

1.2 sDC-SIGN的表达及纯化

将重组表达质粒pET-17b-sDC-SIGN转入BL21(DE3)感受态细胞中,将菌液均匀涂布于含100 mg/L氨苄青霉素的LB琼脂板上,倒置,放入37 ℃培养箱中,反应12~16 h,等到菌落长出来后,挑取单个菌落,接种于含同样浓度氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 ℃震摇(250 r/min)培养过夜。按1∶100转种于同样培养基中,37 ℃震摇培养约2~3 h,至A600 nm为1.0~1.2时,加入IPTG(终浓度1 mmol/L),37 ℃震摇培养3 h。收集细菌并裂菌处理,SDS-PAGE鉴定。将收集的包涵体沉淀用4 ℃预冷的2 mol/L尿素约25 ml洗涤2次后,每克菌约用6 ml 8 mol/L尿素溶解,以pH8.0 预冷PBS进行梯度透析复性后,用1C6-sepharose 4B柱进行亲和层析纯化,以Western-Blot鉴定纯化产物。

1.3 CFSE标记金葡菌

细菌常规培养至对数期,6000 r/min离心10 min,弃上清,用PBS洗涤2次;将细菌调整成为1×10^9 CFU/ml,加入CFSE 1.5 μg/ml,37 ℃避光震摇反应20 min;用PBS洗涤2次,6000 r/min离心10 min,弃上清,以PBS重悬,4 ℃避光保存备用。

1.4 sDC-SIGN对DC吞噬金葡菌的影响

采用密度梯度离心和免疫磁珠负选法分离纯化外周血CD14$^+$单核细胞,用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI 1640培养基培养,加入GM-CSF和IL-4至终浓度各40 ng/ml,培养5 d收集细胞即为imDC。将imDC加入反应孔,2×10^5/孔,按20∶1比例加入CFSE-细菌,然后每孔分别加入sDC-SIGN 0 μg、0.2 μg,37 ℃轻摇反应1 h;FACS洗液洗涤3次,加入PE-anti-CD11c抗体,4 ℃反应30 min;FACS洗液洗涤2次后,上机(FACScalibur)分析。

1.5 sDC-SIGN与金葡菌的结合

常规培养细菌至对数期,6000 r/min离心10 min,弃上清,以PBS洗涤2次,将细菌调整为5×10^7 CFU/ml;加入酶联板孔中,100 μl/孔,室温放置18 h;TBS-T洗板5次,加入含1% BSA的TBS-T封闭,300 μl/孔,37 ℃反应1 h;TBS-T洗板5次,加入含10 mmol/L Ca^{2+}稀释的sDC-SIGN,浓度(μg/ml)分别为40、20、10、5和2.5,室温反应2 h;TBS-T洗板5次,加入anti-CD209抗体(2.5 μg/ml),37 ℃反应1 h;TBS-T洗板5次,加入HRP-羊抗鼠抗体(1∶8000),37 ℃反应30 min;TBS-T洗板5次,显色,用酶标仪测A450 nm。

1.6 sDC-SIGN与金葡菌磷壁酸、脂多糖的结合

将自金葡菌的磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)和脂多糖(lipopolysaccharides, LPS),浓度均为20 μg/ml,4 ℃反应过夜;TBS-T洗板5次,5%BSA-TBS-T封闭,300 μl/孔,37 ℃反应1 h;TBS-T洗板5次,分别加入sDC-SIGN,浓度为0、5、10、20 μg/ml,室温反应2 h;TBS-T洗板5次,加入anti-CD209,2.5 μg/ml,37 ℃反应1 h;TBS-T洗板5次,加入HRP-羊抗鼠,1∶8000稀释,37 ℃反应30 min;TBS-T洗板5次,显色,用酶标仪测$A_{450\ nm}$。

1.7 甘露聚糖、LTA、1C6、4H3对sDC-SIGN与金葡菌结合的影响

细菌常规培养至对数期,6000 r/min,10 min,离心后弃上清,用PBS洗涤2次,将细菌调整成为5×10^7 CFU/ml,100 μl/孔室温包被18 h;TBS-T洗板5次,加入1% BSA的TBS-T封闭,300 μl/孔,37 ℃反应1 h;TBS-T洗板5次,加入10 mM Ca^{2+}稀释的sDC-SIGN,浓度为20 μg/ml,同时分别加入甘露聚糖100 μg/ml,LAT 20 μg/ml,1C6 100 μg/ml,4H3 100 μg/ml,室温反应2 h;TBS-T洗板5次,加入anti-CD209 2.5 μg/ml,37 ℃反应1 h;TBS-T洗板5次,加入HRP-羊抗鼠,1∶8000稀释,37 ℃反应30 min;TBS-T洗板5次,显色,用酶标仪测$A_{450\ nm}$。

1.8 Ca^{2+}对sDC-SIGN与金葡菌结合的影响

细菌常规培养至对数期,6000 r/min,10 min,离心后弃上清,用PBS洗涤2次,将细菌调整成为5×10^7 CFU/ml,100 μl/孔室温包被18 h;TBS-T洗板5次,加入1% BSA的TBS-T封闭,300 μl/孔,37℃反应1 h;TBS-T洗板5次,分别加入含有1 mmol/L Ca^{2+}、10 mmol/L Ca^{2+}稀释的sDC-SIGN,浓度为20 μg/ml,和EDTA 10 mmol/L,室温反应2 h;TBS-T洗板5次,加入anti-CD209 2.5 μg/ml,37 ℃反应1 h;TBS-T洗板5次,加入HRP-羊抗鼠,1∶8000稀释,37 ℃反应30 min;TBS-T洗板5次,显色,用酶标仪测$A_{450\ nm}$值。

1.9 统计学分析

应用SPSS 13.0软件进行数据处理,两组间均数比

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201712.01099v1

较采用两独立样本t检验,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sDC-SIGN的表达及纯化

Western-Blot结果显示,在非还原和还原条件时都在40 000处有目的条带出现,并且,同还原条件相比非还原条件时在高于170 000处还有条带存在(图1),这些条带是sDC-SIGN的高聚体形式。结果表明,sDC-SIGN蛋白的纯度较高,可用于后续实验。

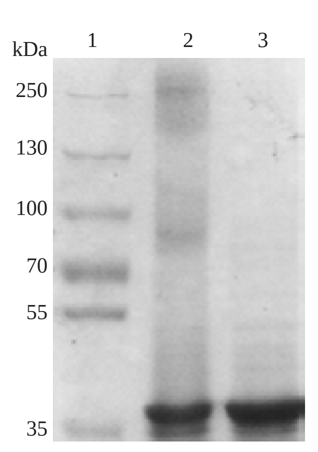


图1 Western-blot鉴定sDC-SIGN

Fig.1 Identification of sDC-SIGN by Western blotting. 1: Protein marker; 2: Unreduced sDC-SIGN ; 3: Reduced sDC-SIGN.

2.2 sDC-SIGN抑制imDC吞噬金葡菌(图2)

imDC能够吞噬金葡菌,但在加入sDC-SIGN(0.2 μg)后,imDC吞噬金葡菌的能力明显下降。

2.3 sDC-SIGN结合金葡菌

ELISA结果显示,sDC-SIGN可与金葡菌结合,且存在浓度依赖关系,结合能力随着sDC-SIGN的浓度增加而增加(图3)。

2.4 sDC-SIGN结合LTA但不结合LPS

ELISA结果显示,sDC-SIGN可与LTA结合,并且随着sDC-SIGN浓度增加,其结合力也随之增强;但sDC-SIGN不与革兰氏阴性菌LPS结合(图4)。

2.5 甘露聚糖、LTA和抗DC-SIGN抗体可阻断sDC-SIGN结合金葡菌

DC-SIGN的配体甘露聚糖和LTA、抗DC-SIGN抗体1C6和4H3均可有效阻断sDC-SIGN与金葡菌的结合(图5),表明sDC-SIGN能特异地与金葡菌表面的糖成分结合。

2.6 sDC-SIGN与金葡菌的结合依赖于Ca^{2+}

sDC-SIGN与金葡菌的结合是Ca^{2+}浓度依赖的,Ca^{2+}浓度越高结合力越强($P<0.05$,图6)。

3 讨论

近年发现,DC-SIGN还存在另一种形式即

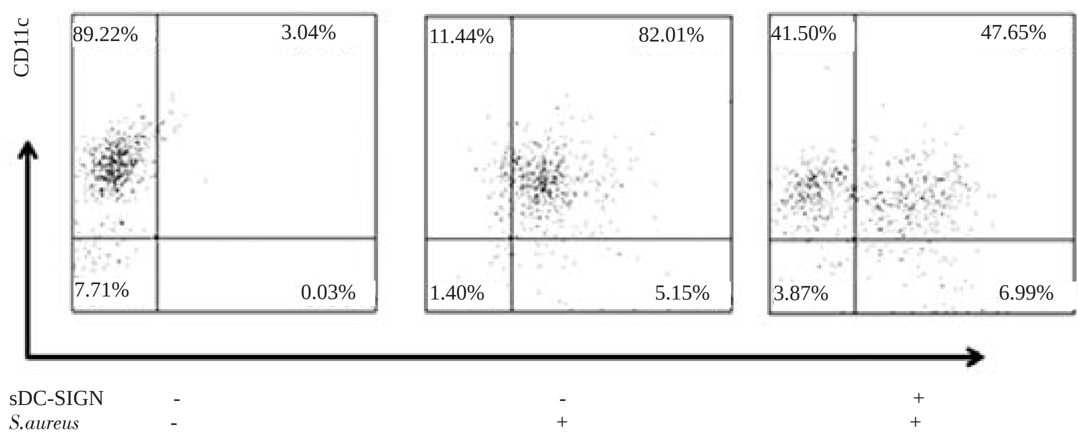


图2 sDC-SIGN抑制imDC吞噬金葡菌

Fig.2 sDC-SIGN suppresses phagocytosis of *S. aureus* by imDC.

sDC-SIGN[5-6]。然而,除了Plazolles等[6]发现sDC-SIGN可促进CMV感染DC和本课题组发现sDC-SIGN可抑制Con A或anti-CD3/CD28活化T细胞的CD69表达、细胞增殖及细胞因子的分泌[8]外,未见其它有关sDC-SIGN作用或其生物学意义的报道。

由于DC表面膜型DC-SIGN可识别并结合外源性配体如病原体糖结构而捕获抗原[12],因此我们首先测试了sDC-SIGN对imDC吞噬金葡菌的影响,发现sDC-SIGN能抑制imDC吞噬金葡菌,然后探索了sDC-SIGN抑制DC吞噬作用的机制。发现sDC-SIGN可结合金葡菌、LTA但对LPS则否。LTA是来自金葡菌的磷壁酸,而LPS为革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分,则上述结果表明sDC-SIGN可选择性识别并结合金葡菌表面的磷壁酸。发现sDC-SIGN与金葡菌的结合可被DC-SIGN的配体甘露聚糖和LTA、抗人DC-SIGN抗体1C6和4H3有效阻断,表明sDC-SIGN与金葡菌的

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201712.01099v1

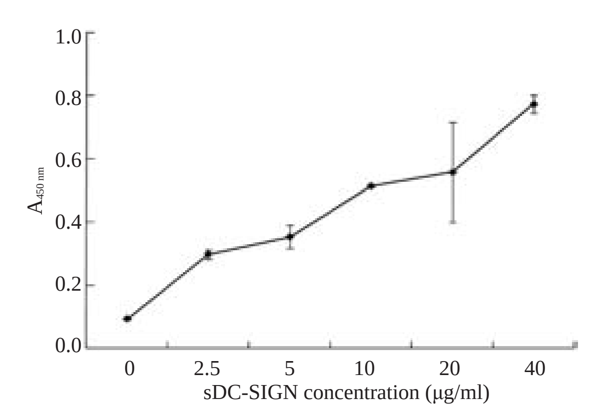


图3 ELISA分析sDC-SIGN与金葡菌的结合

Fig.3 Analysis of sDC-SIGN binding to *S. aureus* by ELISA.

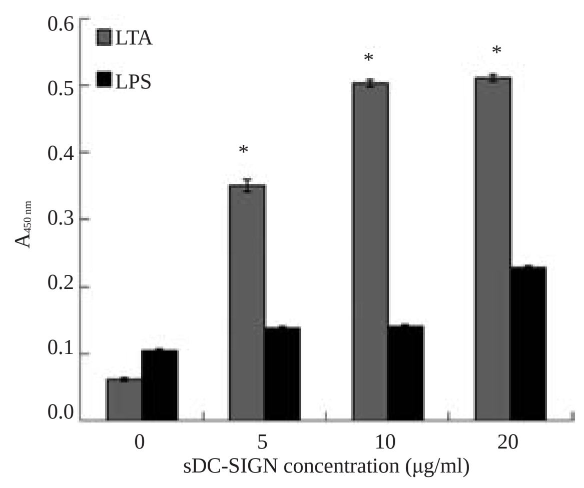


图4 ELISA分析sDC-SIGN与LTA、LPS的结合

Fig.4 Analysis of sDC-SIGN binding to LTA and LTA by ELISA. **P*<0.05 *vs* 0 μg/ml sDC-SIGN concentration group.

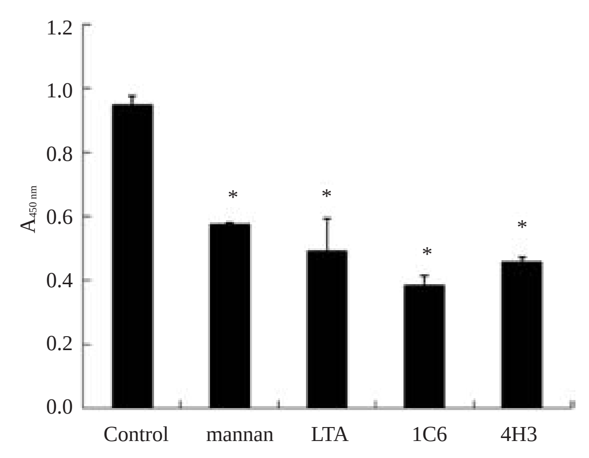


图 5 ELISA 分析甘露聚糖、LTA、1C6、4H3 对 sDC-SIGN结合金葡菌的影响

Fig.5 Effect of mannan, LTA, 1C6 and 4H3 on sDC-SIGN binding to *S. aureus*. **P*<0.05 *vs* control group.

结合是特异的。此外，还发现sDC-SIGN与金葡菌的结合呈Ca^{2+}依赖性，Ca^{2+}浓度越高二者的结合越强，进一步证实sDC-SIGN能够与金葡菌表面的糖成分结合。因

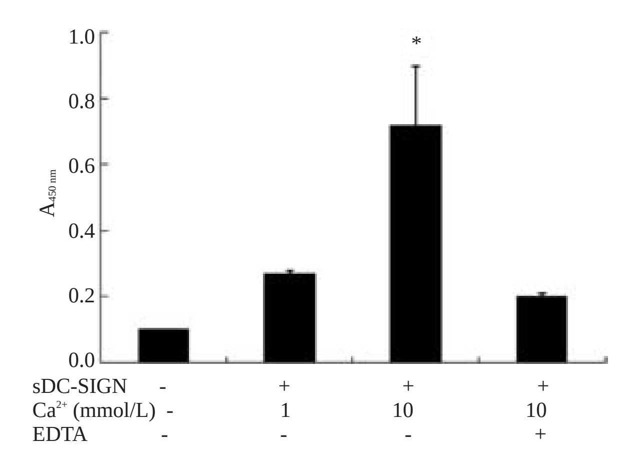


图6 ELISA分析Ca^{2+}对sDC-SIGN与金葡菌结合的影响

Fig.6 Effect of Ca^{2+} on sDC-SIGN binding to *S. aureus*. **P*< 0.05 *vs* control or EDTA group.

此，本实验结果表明，sDC-SIGN可抑制imDC对金葡菌的捕获和吞噬，其机制是sDC-SIGN优先与金葡菌表面糖成分结合从而抑制了DC膜上DC-SIGN对金葡菌的捕获。

imDC主要负责捕获抗原，在启动获得性免疫应答中发挥关键作用。膜型DC-SIGN识别并结合外源性配体如病原体糖结构而捕获抗原，并与T细胞表面ICAM-3相互作用，参与形成免疫突触，触发初始T细胞应答[13-14]。另一方面，某些慢性感染病原体如HIV、结核杆菌等通过膜型DC-SIGN介导内吞进入DC，抑制DC功能并利用其作为"特洛伊木马"逃避宿主免疫系统攻击，而且与易感细胞表面配体如ICAM-3、Lewis糖相互作用，形成感染性突触而感染新的宿主细胞[15-16]。我们发现sDC-SIGN对imDC吞噬金葡菌具有抑制作用，提示sDC-SIGN可能具有免疫调节意义并抑制某些病原体感染宿主细胞。然而，这种作用的生物学意义和病理学意义尚待进一步研究。

参考文献：

[1] Svajger U, Anderluh M, Jeras M, et al. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity[J]. Cell Signal, 2010, 22(10): 1397-405.

[2] Santiago K, Bomfim GF, Criado PR. Monocyte-Derived dendritic cells from patients with dermatophytosis restrict the growth of trichophyton rubrum and induce CD4-T cell activation[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e110879.

[3] den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses[J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(7): 1149-57.

[4] Streng-Ouwehand I, Unger WW, Van Kooyk Y. C-type Lectin Receptors for Tumor Eradication:Future Directions[J]. Cancers (Basel), 2011, 3(3): 3169-88.

[5] Mummidi S, Catano G, Lam L, et al. Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201712.01099v1

grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms - Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts[J]. J Biol Chem, 2001, 276(35): 33196-212.

[6] Plazolles N, Humbert JM, Vachot L, et al. Pivotal advance: the promotion of soluble DC-SIGN release by inflammatory signals and its enhancement of cytomegalovirus-mediated cis-infection of myeloid dendritic cells[J]. J Leukoc Biol, 2011, 89(3): 329-42.

[7] 刘 莹, 左大明, 卢 晓, 等. 人DC-SIGN全长编码区基因的克隆及其胞外段的原核表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(5): 396-8, 405.

[8] 马 静, 刘 莹, 卢 晓, 等. 可溶性DC-SIGN对T淋巴细胞增殖及分泌细胞因子的调节作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(8): 856-8.

[9] 张 婧, 张丽芸, 卢 晓, 等. 人可溶性DC-SIGN的原核表达及鉴定[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(6): 701-3, 707.

[10] Nagl M, Kacani L, Mullauer B, et al. Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(6): 1165-8.

[11] Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, et al. Cutting edge: Carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells[J]. J Immunol, 2003, 170(4): 1635-9.

[12] Ehlers S. DC-SIGN and mannosylated surface structures of Mycobacterium tuberculosis: a deceptive liaison[J]. Eur J Cell Biol, 2010, 89(1): 95-101.

[13] Berg LM, Gringhuis S, Geijtenbeek TB. An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1253(1): 149-58.

[14] van den Berg LM. Gejjtenbeek TB.antiviral immune response by human langerhans cells and dendritic cells in HIV-infection[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 762(1): 45-70.

[15] Koethe S, Avota E, Schneider-Schaulies S. Measles virus transmission from dendritic cells to T cells:forming of synapse-like interface concentrating viral and cellular components[J]. J Viral, 2012, 86(18): 9773-81.

[16] Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, et al. Dendritic cell-specific ICAM-3 gabbing nonintegrin mediates HIV-1 infection of and transmission by M2a-polarized macrophages *in vitro*[J]. AIDS, 2013, 27(5): 707-16.

(编辑:孙昌朋)

(上接525页)

[5] Sun W, Lou YH, Dean J, et al. A contraceptive peptide vaccine targeting sulfated glycoprotein ZP2 of the mouse zona pellucida[J]. Biol Reprod, 1999, 60(4): 900-7.

[6] Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, et al. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs[J]. Dev Cell, 2003, 5(1): 33-43.

[7] Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, et al. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein[J]. Science, 2010, 329(5988): 216-9.

[8] Xie Y, Yu Y, Nie C, et al. Mouse granulosa cells contribute more to the mRNA synthesis of mZP2 than oocyte does[J]. Cell Biochem Funct, 2010, 28(8): 661-7.

[9] 谢 妍, 乜春城, 曹佐武. 小鼠ZP2 mRNA在卵泡颗粒细胞层的表达[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2010, 31(2): 116-9.

[10] 徐 放, 谢杏美, 孔明惠, 等. 重组人卵ZP3肽段在毕赤酵母中的表达[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2010, 31(6): 533-8.

[11] 徐万祥, 何亚萍, 洪爱真, 等. 人卵透明带蛋白huZP3a22-176和huZP33b177-348肽段在大肠杆菌中的表达及其纯化[J]. 生殖与避孕, 2004, 24(3): 143-8.

[12] 宋力雯, 汪玉宝, 倪 崖, 等. 人卵透明带蛋白ZP3a和ZP3b肽段的免疫原性及其抗血清体外抑制人精子-半透明带结合[J]. 生理学报, 2005, 57(6): 682-8.

[13] 王焱冰, 李轶杰, 张富春. 草原兔尾鼠卵透明带3融合蛋白抗原的制备及免疫反应性[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(4): 244-7, 251.

[14] 郭 焱, 曲晓波, 金宁一. 重组人卵透明带蛋白3的制备及其免疫学活性分析[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25(12): 1119-21.

[15] 乜春城, 禹艳红, 谢 妍, 等. 小鼠ZP2肽的基因克隆和原核表达载体的构建[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2011, 32(4): 374-8.

[16] Bleil J GJ, Wassarman P. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida:role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs[J]. Dev Biol, 1988, 128(2): 376-85.

[17] Melendrez CS, Meizel S, Berger T. Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction *in vitro*[J]. Mol Reprod Dev, 1994, 39(4): 433-8.

[18] Pang PC, Chiu PC, Lee CL, et al. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis (x) oligosaccharide on the zona pellucida[J]. Science, 2011, 333(650): 1761-4.

(编辑:孙昌朋)